Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Dünndarmtransplantation bei Ratten

Operationen und Untersuchung der Schleimhautregeneration mit Hilfe der quantitativen Autoradiographie

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
MICHAEL MARTIN
aus Rottweil

1983

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Dünndarmtransplantation bei Ratten

Operationen und Untersuchung der Schleimhautregeneration mit Hilfe der quantitativen Autoradiographie

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
MICHAEL MARTIN
aus Rottweil

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. W. Frommhold

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. W. Heitland

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. Bockhorn

---

gedruckt bei H.- J. Köhler , Reprografischer Betrieb , Tübingen

INHALTSÜBERSICHT

1. EINLEITUNG 1
2. MATERIAL UND METHODEN 2
2.1 OPERATIONEN 2
2.1.1 VERSUCHSGRUPPE 2
2.1.1.1 Tiere 2
2.1.1.2 Prä- und postop. Versorgung ... 2
2.1.1.3 Narkose 2
2.1.1.4 Operationstechnik 2
2.1.1.5 Postoperativer Verlauf 5
2.1.2 KONTROLLGRUPPE 5
2.1.2.1 Operationstechnik 5
2.1.2.2 Postoperativer Verlauf 6
2.2 RELAPARATOMIE 6
2.2.1 VERSUCHSGRUPPE 6
2.2.2 KONTROLLGRUPPE 7
2.3 HISTOLOGIE 7
2.4 AUTORADIOGRAPHIE 8
2.4.1 DIPPINGTECHNIK 8
2.4.2 EXPOSITION 9
2.4.3 ENTWICKLUNG, FIXIERUNG 10
2.4.4 FÄRBUNG 11
2.4.5 ZÄHLVERFAHREN 11
3. ERGEBNISSE 13
3.1 MAKROSKOP. ENTWICKLUNG ...13
3.2 HISTOLOGISCHE BEFUNDE ...14
3.3 AUTORADIOGRAPH. BEFUNDE..16
4. DISKUSSION 22
5. ZUSAMMENFASSUNG 30
6. LITERATURVERZEICHNIS 32
7. LEBENSLAUF 36

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547620_0060

1 EINLEITUNG

Bis heute gibt es nur wenige Erfahrungen mit der Dünndarmtransplantation beim Menschen. Sie ist immer noch die Ultima ratio in der Behandlung von Dünndarmerkrankungen. Von den wenigen bis heute durchgeführten Dünndarmtransplantationen wurde keine längere Zeit überlebt.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Schleimhautregeneration nach isogener Dünndarmtransplantation im Tierversuch.

Wir berichten über Technik und Ergebnisse von Dünndarmtransplantationen bei immunogenetisch definierten Inzuchtratten, sowie über Versuche zur Bestimmung des Markierungsindex der Schleimhautepithelien aus den Transplantaten mit Hilfe der quantitativen Autoradiographie.

Zur Analyse dieser Reparationsvorgänge ist die Autoradiographie mit Tritium-Thymidin ein geeignetes Verfahren, womit eine Markierung des Zellkerns erfaßt wird, die während der prämitotischen Verdopplung der genetischen DNS erfolgt.

Die Darmepithelien eignen sich wegen ihrer kurzen Generationsdauer und der damit verbundenen Mitosehäufigkeit besonders gut für Untersuchungen der Regenerationsfähigkeit.

Im Vergleich mit den Befunden aus der Literatur und den eigenen Ergebnissen wird ein Modell über die Mechanismen der Schleimhautregeneration nach Dünndarmtransplantation vorgestellt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 O P E R A T I O N E N

2.1.1 VERSUCHSGRUPPE

2.1.1.1 Tiere

Die Versuche wurden mit männlichen Ratten des Inzuchtstammes Sprague-Dawley durchgeführt. Die Tiere wogen zwischen 250 und 350 g.

2.1.1.2 Prä- und postoperative Versorgung

Zwölf Stunden präoperativ wurde den Tieren die Nahrung entzogen und eine Stunde präoperativ wurden 50 USPE Heparinsulfat i.m. injiziert.

Postoperativ erhielten die Tiere drei Tage lang kein Futter. In dieser Zeit wurden ihnen 2 x tgl. 30 USPE Heparinsulfat i.m. gespritzt.

2.1.1.3 Narkose

Alle Eingriffe wurden in Äthernarkose durchgeführt.

2.1.1.4 Operationstechnik

Die Operationstechnik wurde im wesentlichen von HOFMANN (10) übernommen.

Die Operation wurde mit mikrochirurgischem Instrumentarium vorgenommen und mit mikrochirurgischer Technik

und Lupenbrille mit dreifacher Vergrößerung durchgeführt.

Als Nahtmaterial wurden verwendet:

5 - O Mersilene für Unterbindungen
7 - O Seide für Gefäßnähte
6 - O Vicryl für Darmnähte
4 - O Prolene für Bauchwand

Explantation:

Das Abdomen des Spendertieres wurde durch einen Medianschnitt vom Xiphoid bis zur Symphyse eröffnet. Nach Eröffnung des Retroperitoneums erfolgte die Freipräparierung der Pfortader mit Unterbindung aller zuführenden Äste von der Porta hepatis bis zu den Dünndarmvenen. Anschließend wurde die Aorta abdominalis freipräpariert, die Arteria mesenterica sup. bis zum Dünndarm dargestellt und alle abgehenden Gefäße unterbunden.

Das für die Transplantation vorgesehene Darmstück wurde oral und aboral mit Klips markiert. Im folgenden wurden die nichtzugehörigen Arkaden unterbunden, sodaß das Transplantat nur noch an den Gefäßstielen der Arteria mes. sup. und der Vena portae hing. Der Darm wurde an den Klips durchtrennt und mit 1%iger Neomycinsulfatlösung gespült. In die Aorta wurde distal des Abgangs der Arteria mes. sup. eine Infusionskanüle eingeführt und mit einer Ligatur fixiert. Die Perfusion wurde begonnen und die Aorta proximal des Abgangs der Arteria mes. sup. ligiert, sodaß der Flüssigkeitsstrom in den Gefäßen des Explantats nicht zum Stillstand kam und die Entstehung von Thrombosen vermieden wurde.

Perfundiert wurde mit 0,9%iger NaCl -Lösung, die 10 000 USPE Heparinsulfat/l enthielt.

Sodann wurde die Pfortader möglichst nahe der Porta hepatis durchtrennt, desgleichen die Aorta distal der Perfusionskanüle und proximal der Unterbindung.
Das an der Perfusionskanüle hängende Transplantat wurde in eine auf 4° C gekühlte Kochsalzlösung mit 500 mg Neomycinsulfat/l gegeben.

Das Spendertier wurde durch eine Überdosis Äther getötet.

Implantation:

Nach Narkotisierung und Eröffnung des Abdomens des Empfängertieres wurde die Vena cava inf. distal der Einmündung der Vena renalis dextra, sowie die Aorta abdominalis unterhalb des Abgangs der Arteria renalis sinistra mobilisiert.

Damit waren die Stellen für die Gefäßanschlüsse vorbereitet und das Transplantat konnte aus der Kühlflüssigkeit entnommen werden.
Die Perfusionsnadel wurde aus der Aorta entfernt und das Gefäß auf einen ca. 2 mm langen Stumpf unterhalb der A. mes. sup. gekürzt.
Es wurde nun zuerst die venöse End-zu-Seit-Anastomose zwischen der V. portae des Transplantats und der V. cava inf. des Empfängers genäht. Dann wurde die Pfortader des Transplantats mit einem Klip abgeklemmt, damit kein Blut retrograd einfließen konnte und die Nahtstelle bis zur Dichtigkeit komprimiert.
Es folgte die Vernähung der Aorta des Transplantats mit der Aorta des Empfängers End-zu-Seit und Abdich-

tung auf gleiche Weise.
Nun wurden die Klips von den Transplantatgefäßen entfernt und das Transplantat wurde durchblutet.

Aus dem Darm des Empfängertieres wurde nun das dem Transplantat entsprechende Stück entnommen und das Transplantat an dieser Stelle mit einschichtigen invertierenden Nähten interponiert, sowie das Mesenterium adaptiert.
Das Abdomen wurde nach Spülung mit 1%iger Neomycinsulfatlösung mittels zweischichtiger Naht verschlossen.

Die Ischämiezeiten für die Transplantate betrugen im Mittel 55-70 min., die gesamte Operation dauerte zwischen 120 und 160 min.

2.1.1.5 Postoperativer Verlauf

Von insgesamt 23 durchgeführten Transplantationen verstarben drei Tiere intraoperativ entweder an Atemstillstand durch Ätherüberdosierung oder im Volumenmangelschock durch starke Hypersekretion aus dem Darmlumen des Transplantats.
Zwei Tiere verstarben am ersten Tag p.o. an Nachblutungen im Anastomosenbereich,
zwei Tiere am dritten Tag p.o. an Ileus.
Die übrigen Tiere wurden nach einer, zwei, drei und vier Wochen in Gruppen relaparatomiert.

2.1.2 KONTROLLGRUPPE

2.1.2.1 Operationstechnik

Unter gleichen Bedingungen (Tierstamm, prä- und postoperative Versorgung, Narkose) wurde bei zehn Tieren

ein dem Transplantat der Versuchsgruppe in Lage und Größe entsprechendes Darmstück ohne Manipulation an den Gefäßen durchtrennt und sofort wieder orthotop reanastomosiert.
Die Bauchhöhle wurde ebenfalls nach Spülung mit 1%iger Neomycinsulfatlösung mittels zweischichtiger Naht verschlossen.
Der Eingriff dauerte im Mittel 20 min.

2.1.2.2 Postoperativer Verlauf

Alle Tiere vertrugen die Operation gut und überlebten bis zur Relaparatomie nach zwei Wochen ohne Komplikationen.

2.2 R E L A P A R A T O M I E

2.2.1 VERSUCHSGRUPPE

Die 16 Transplantat-Empfängertiere wurden in Gruppen zu je vier Tieren eine, zwei, drei und vier Wochen postoperativ relaparatomiert.
In leichter Äthernarkose wurde den Tieren je 1 µCi ^{3}H-Thymidin pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert. 45 min. danach wurde das Abdomen eröffnet und nach Lösen der Verwachsungen die Arteria mes. sup. des Transplantats dargestellt.

Genau 60 min. nach Injektion des Tritium-Thymidins wurde das Gefäß kanüliert, mit einer Ligatur gesichert und mit 0,9%iger NaCl-Lösung ca. 5 min. perfundiert, sodaß das Transplantat völlig entblutet war.
Die Kontamination des Transplantats mit dem radioaktiven Thymidin konnte somit auf nahezu genau 60 min. begrenzt werden.
Das Transplantat wurde anschließend herausgetrennt

und in Formalin 4% fixiert.
Das Tier wurde dann durch eine Überdosis Äther und Entblutung getötet.

2.2.2 KONTROLLGRUPPE

In genau derselben Weise wurde mit den zehn Tieren der Kontrollgruppe verfahren, die zwei Wochen postoperativ mit Tritium-Thymidin markiert und relaparatomiert wurden.

2.3 H I S T O L O G I E

Die in Formalin fixierten Transplantate wurden in Paraffin eingebettet.
Zur Herstellung der Präparate wurden die dabei verwendeten Objektträger durch mehrstündiges Eintauchen in konz. Chromschwefelsäure (100 g Kaliumbichromat, 100 ml konz. Schwefelsäure, 1000 ml Wasser) gereinigt und bis zur weiteren Bearbeitung in Aqua dest. belassen.

Als Haftgrund für die zur Autoradiographie verwendete Filmemulsion wurde als nächster Schritt eine Chromalaungelatineschicht auf die Objektträger in folgender Weise aufgebracht:
In 1000 ml warmes Wasser werden 5 g Gelatine und 0,5 g Chromalaun (Kaliumchrom-III-Sulfat) gelöst und die getrockneten Objektträger darin eingetaucht. Diese Chromalaungelatine-Schicht ist 1/1000 bis 1/100 µ dick und beeinflußt die Absorbtion der ß-Teilchen nicht. Sie genügt zur besseren Haftung sowohl des Films als auch der Schnitte (1).

Nach Austrocknung der so behandelten Objektträger

im Brutschrank wurden die gewässerten, ca. 3 µ dicken Schnitte aufgetragen und anschließend in folgender Reihe entparaffiniert:
Xylol, Äthanol 100%, 96%, 70%, Aqua dest.

Von allen Präparaten wurden außerdem Schnitte auf unbehandelte Objektträger aufgebracht und einer H.E. - sowie van Gieson-Färbung unterzogen.

2.4 A U T O R A D I O G R A P H I E

2.4.1 DIPPING-TECHNIK

Die Photoemulsion, die in Gelform geliefert wird, besteht aus einer Gelatinegrundmasse, in die ein Anteil an Silberhalogenid eingelagert ist.

Beim Auftreffen der elektrisch geladenen radioaktiven Strahlenpartikel (ß-Teilchen) auf den Film kommt es zur Ionisation und Elektronenbildung und zu einer strukturellen Veränderung am Gitter der Silberhalogenidkristalle.
Wird danach die Photoemulsion mit einem Entwickler behandelt, so wandeln sich die durch die Strahlung veränderten Silberbromidkristalle in metallische Silberknäuel um, unbelichtete Kristalle bleiben unverändert: das primär vorhandene Latenzbild wird ein reales Bild (1).

Verwendet wurde die Ilford-K5-Emulsion, die sich sehr dünn auf das Präparat auftragen läßt und sich im Gegensatz zum Stripping-Film nicht mitfärbt.
Die Lagerung des Films erfolgte bei 3 °C.
Die Emulsion liefert bei entsprechender Verdünnung eine 25 - 30 µm dicke Schicht. Bei der quantitativen

Auswertung von Tritium sollte diese Schicht mindestens 3 µ betragen, also über der maximalen Reichweite der ^{3}H-ß-Partikel liegen.
Zwei Faktoren beeinflussen die Schichtdicke:
die Temperatur und
der Grad der Verdünnung.
Wir verdünnten die Photoemulsion 1:1 mit Aqua dest. und hielten die Temperatur konstant auf 40°C. Sämtliche Arbeitsschritte, von der Entnahme des Films aus der Verpackung bis zur Fixierung, wurden in der Dunkelkammer unter 15 Watt Rotlicht und konstanter Lufttemperatur von 20°C durchgeführt.

Nach dem Erwärmen und Verdünnen der Emulsion wurde diese ca. 10 min. bis zum Aufsteigen aller Luftblasen stehengelassen.
Die - wie in 2.3 beschrieben - vorbehandelten und mit den Schnitten belegten Objektträger wurden nun langsam in die Emulsion getaucht und danach ca. 2 Std. - bei völliger Dunkelheit - luftgetrocknet.

Um den Grad der Nullstrahlung (Standardnullwert) zu ermitteln (siehe 2.4.5) und um diesen bei der Auszählung der markierten Kerne berücksichtigen zu können, wurden jeder Serie von zu exponierenden Präparaten Objektträger beigegeben, welche mit Photoemulsion, nicht aber mit Präparaten versehen waren.

2.4.2 EXPOSITION

Nach der Trocknung der befilmten Objektträger wurden die Präparate in Clay-Adams-Boxen verbracht, die Kieselgel mit einem Feuchtigkeitsindikator enthielten. Diese Boxen wiederum wurden in einer Sammelbox untergebracht, die eine größere Menge $CaCl_2$ enthielt.

Dadurch war absolute Lichtundurchlässigkeit und konstant minimale Luftfeuchtigkeit gewährleistet.
Die Expositionstemperatur betrug 4°C.

Während der Exposition mußte die radioaktive Substanz (Tritium) durch Abgabe ihrer Strahlung ausreichend lange auf den Film einwirken, um ein Latenzbild zu erzeugen (Belichtung).
Die Expositionszeit wurde von uns durch mehrere Pilotpräparate experimentell ermittelt, denn sie ist abhängig von der Dicke der Schnitte und der Verdünnung der Filmemulsion.
Die Einwirkung der radioaktiven Strahlung auf die Photoemulsion beginnt mit dem Augenblick ihrer beendeten Trocknung.

Bei beabsichtigter quantitativer Autoradiographie mußte darauf geachtet werden, daß einerseits genügend radioaktive Zerfälle über den Zellkernen stattfinden konnten, andererseits durch zu lange Exposition keine Überlagerung der Silberkornhaufen entstand.
Die Expositionszeit unserer Präparate betrug 14 Tage, was zu einer gut auswertbaren Silberkorndichte führte.

2.4.3 ENTWICKLUNG, FIXIERUNG

Die photographische Entwicklung eines Autoradiogramms wandelt das Latenzbild in ein optisch sichtbares Bild um.
Folgender Entwickler wurde verwendet:

2,2 g Metol
72,0 g Na-Sulfit
8,8 g Hydrochinon
48,0 g Na-Carbonat
4,0 g Kaliumbromid

Man erwärmt 750 ml Aqua dest. auf 40°C und gibt die o.g. Reagentien in der angegebenen Reihenfolge dazu. Zum Schluß wird auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und auf 20°C abgekühlt.

Zur Fixierung wurde Unifix Fixierbad von Ilford verwendet, 1:2 mit Aqua dest. verdünnt.
Die Präparate wurden in der Dunkelkammer bei Rotlicht und 20°C Lufttemperatur 6 min. entwickelt, 4 min. gewässert, 10 min. fixiert und anschließend in Aqua dest. belassen.

2.4.4 FÄRBUNG

Nach dem Entwickeln, Fixieren und Trocknen wurden die Präparate durch den Film hindurch mit H.E. gefärbt, ohne daß das autoradiographische Resultat dadurch beeinflußt wurde.
Die Präparate wurden nach Färbung mit Hämatoxylin erneut gründlich luftgetrocknet und dann mit Eosin gegengefärbt.
Nach nochmaligem Trocknen und Passieren der Alkoholreihe wurde in Methylbenzoat das restliche Wasser entzogen und dann das Präparat in Balsam eingedeckt.
Die Montage in Balsam führte zum Schrumpfen der Emulsion und damit zu einem "Absinken" der Silberkörner auf dem Schnitt, wodurch das Auflösungsvermögen erhöht wurde.

2.4.5 ZÄHLVERFAHREN

Die Auszählung erfolgte bei 1000facher Vergrößerung unter Ölimmersion.
Berücksichtigt wurden dabei ausschließlich die Zellen der Lieberkühnschen Krypten im Stratum basale der

Jejunumschleimhaut.
Es wurden jeweils einzelne Krypten ganz ausgezählt. Von jedem Präparat waren vier Schnitte aus verschiedenen Lokalisationen angefertigt worden. Von jedem Schnitt wurden je 1000 Zellen nach Stichproben ausgezählt. Es wurde die Zahl der markierten und der unmarkierten Zellen pro Gesichtsfeld bestimmt.
Unter Berücksichtigung der Nullstrahlung wurden nur solche Kerne als markiert identifiziert, denen mehr als fünf Silberkörner zuzuordnen waren.

Die Nullstrahlung (Standardnullwert) ist grundsätzlich jene Strahlung, die den Film außerhalb der markierten Schnittpartien schwärzt.
Diese Strahlung kann ihre Ursachen haben in der Umgebungsstrahlung, der elektrostatischen Entladung bei zu geringer Luftfeuchtigkeit, in der Anwesenheit von Restlicht in der Dunkelkammer, und sie ist außerdem abhängig von der Konzentration des Entwicklers und der Entwicklungsdauer.
Zur Ermittlung des Standardnullwerts siehe 2.4.1.

3 ERGEBNISSE

Von den 23 Tieren der Versuchsgruppen konnten nur 16 zur Beurteilung der Transplantationsergebnisse herangezogen werden.
Ein Tier verstarb intraoperativ an Atemstillstand durch Ätherüberdosierung,
zwei Tiere bei der Fertigstellung der Darmanastomosen an Volumenmangel, hervorgerufen durch starke Hypersekretion aus dem Lumen des Transplantats,
zwei Tiere verstarben am ersten postoperativen Tag an Nachblutungen aus den Gefäßanastomosen,
zwei Tiere am dritten postoperativen Tag an den Folgen eines Ileus.

3.1 M A K R O S K O P I S C H E E N T W I C K - L U N G D E R T R A N S P L A N T A T E

Hier konnten die Ergebnisse von HOFMANN (10) im wesentlichen bestätigt werden.
Sämtliche Transplantate der Versuchsgruppen zeigten eine Fibrosierung und zum Teil ausgeprägte Dilatation bei guter Durchgängigkeit der Darmanastomosen.
Bei allen Transplantaten war der Darm rosig und zeigte keine Anzeichen einer Durchblutungsstörung.

Bei der Autopsie der beiden an Ileus gestorbenen Tiere zeigte sich eine Stenose der aboralen Darmanastomose mit einer maximalen prästenotischen Aufweitung des Darms.

Die durchgetrennten und reanastomosierten Darmabschnitte der Kontrollgruppe waren unauffällig und makroskopisch nur durch geringgradige Verwachsungen

vom restlichen Darm zu unterscheiden.

3.2 H I S T O L O G I S C H E B E F U N D E

Untersucht wurden die allgemeinen Veränderungen der Transplantate.
Wie schon HOFMANN in seiner Untersuchung gezeigt hat, fand sich nach der ersten bis zur zweiten Woche ein vollständiger Verlust der Villi. Die Zottenbasen waren verbreitert und verplumpt. Die Tunica muskularis war stark verbreitert und mit bindegewebigen Einlagerungen durchsetzt, und zwar vor allem die Ringmuskulatur, weniger die Längsmuskulatur.
Nach vier Wochen hatten sich die Zotten weitgehend regeneriert, blieben jedoch kürzer und dicker als beim Darm der Kontrollgruppe.
Auch blieb die Verbreiterung der Ringmuskulatur bestehen.

Tab. 1 Dünndarmtransplantation bei 23 Ratten
Operationsdaten der Versuchsgruppen

Gruppe/ Tier	OP-Dauer (min)	Ischämie (min)	Überlebens-zeit (Tage)	Komplikationen
I/1	160	70	7	-
I/2	140	70	7	-
I/3	-	90	ex in tab.	Vol.-Mangel
I/4	125	60	7	-
I/5	120	60	7	-
II/1	-	-	ex in tab.	Ätherüberdos.
II/2	165	80	3	Ileus
II/3	130	65	14	-
II/4	130	60	14	-
II/5	155	70	1	Nachblutungen
II/6	125	55	14	-
II/7	130	55	14	-
III/1	120	55	21	-
III/2	140	65	21	-
III/3	145	75	21	-
III/4	125	60	1	Nachblutungen
III/5	160	80	3	Ileus
III/6	130	60	21	-
IV/1	125	65	28	-
IV/2	-	80	ex in tab.	Vol.-Mangel
IV/3	135	80	28	-
IV/4	130	70	28	-
IV/5	120	60	28	-

3.3 AUTORADIOGRAPHISCHE BEFUNDE

Setzt man den Markierungsindex der Kontrollgruppe von 50 % als Ausgangswert, so zeigt sich, daß bei den Transplantaten eine Woche postoperativ durchschnittlich 70 %, nach zwei Wochen 65 %, nach drei Wochen 55 % der Kryptenzellen markiert waren und daß vier Wochen postoperativ der Markierungsindex wieder auf die Höhe dessen der Kontrollgruppe mit 50 % gesunken ist. (Vgl. Abb. 1 und Tab. 2 und 3)

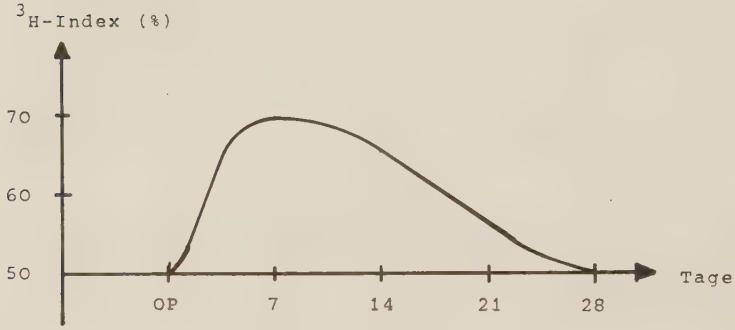

Abb. 1 Zeitlicher Verlauf des ^{3}H-Index

Bei zwei Transplantaten (beide mit Ischämiezeiten über 70 min.) konnten keine signifikanten Markierungen nachgewiesen werden.
Hier waren nicht nur die Zotten, sondern die gesamte Mucosa bis auf einige Schleimhautinseln zerstört.

Tab. 2 Ergebnisse bei den beurteilbaren Transplantaten der Versuchsgruppen

Gruppe/ Tier	Überlebenszeit (Tage)	Markierungsindex (%)
I/1	7	72
I/2	7	70
I/4	7	68
I/5	7	75
II/3	14	60
II/4	14	45
II/6	14	67
II/7	14	65
III/1	21	50
III/2	21	55
III/3	21	Ø Markierungen
III/6	21	57
IV/1	28	45
IV/3	28	Ø Markierungen
IV/4	28	50
IV/5	28	48

Tab. 3 Ergebnisse der Kontrollgruppe

Tier	OP-Dauer (min.)	Überlebenszeit (Tage)	Markierungs-index (%)
1	30	14	45
2	30	14	55
3	25	14	43
4	30	14	52
5	20	14	50
6	20	14	50
7	25	14	55
8	20	14	55
9	25	14	42
10	25	14	50

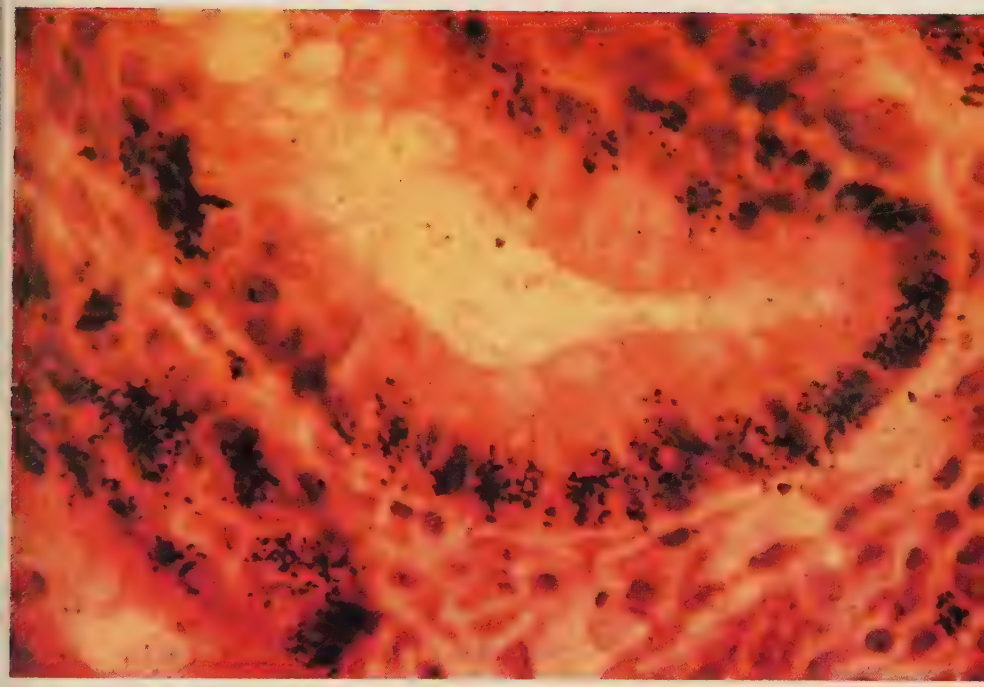

Abb. 2 Jejunum - Kryptenzellen, Markierungsindex
Präparat aus Gruppe I Färbung: H.E.

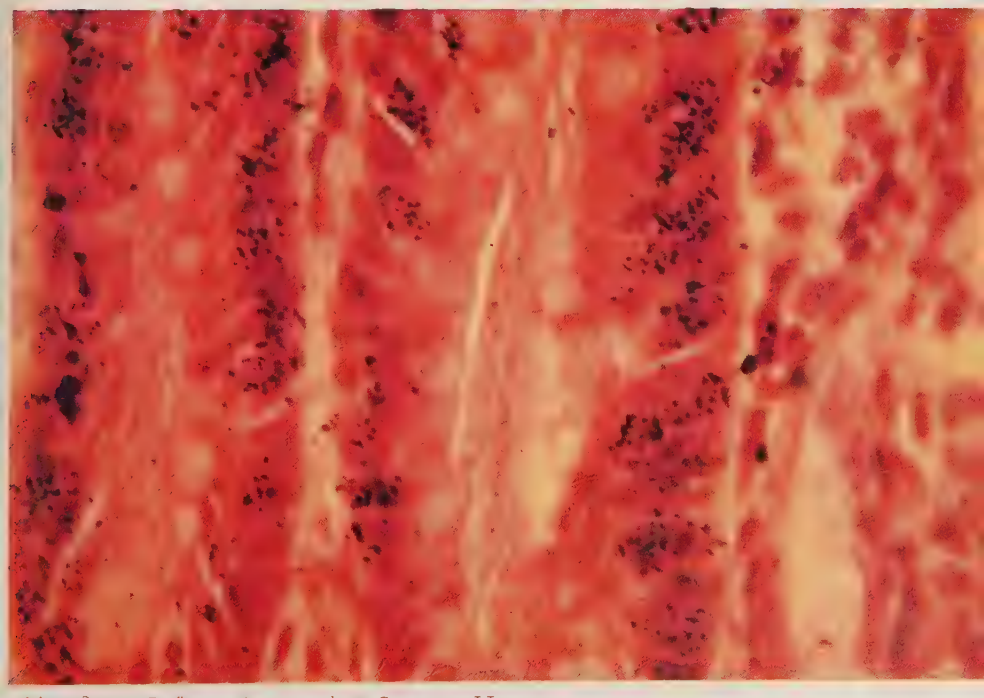

Abb. 3 Präparat aus der Gruppe II

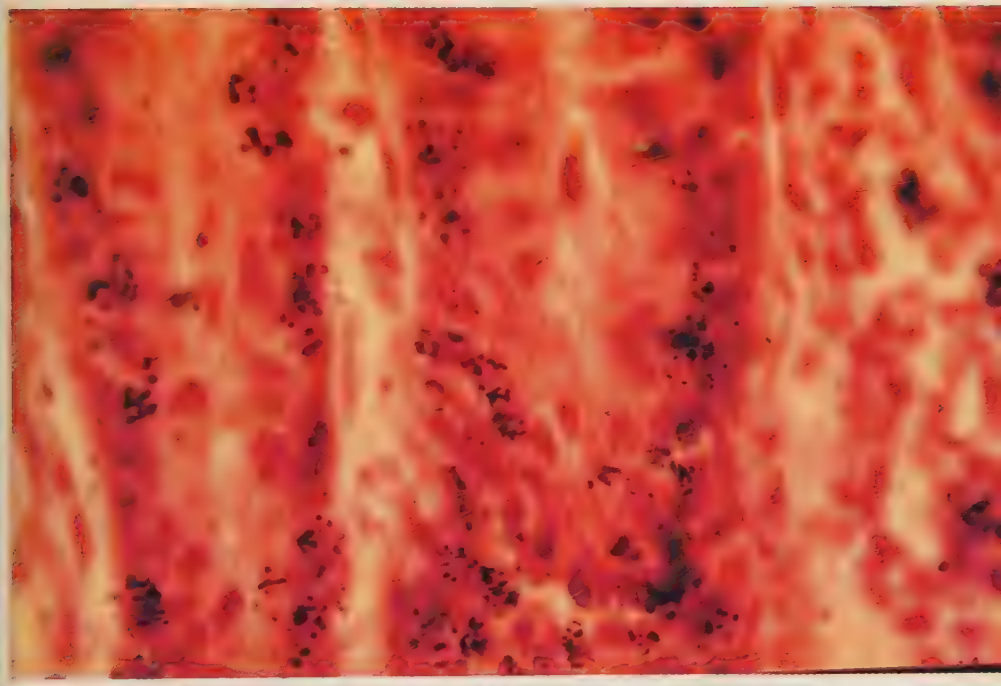

Abb. 4 Präparat aus der Gruppe III

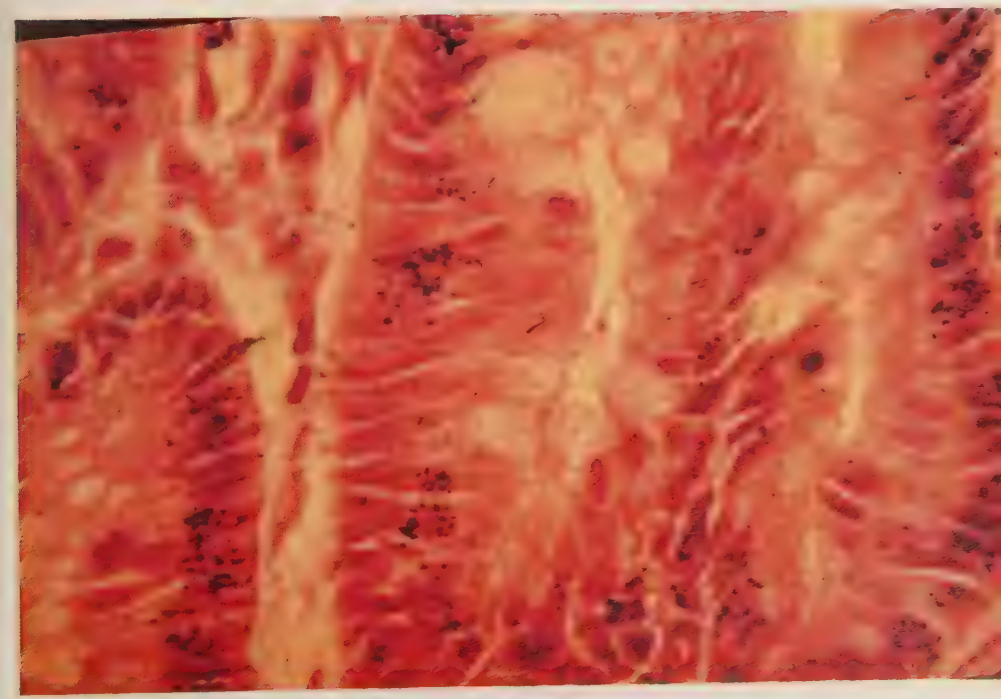

Abb. 5 Präparat aus der Gruppe IV

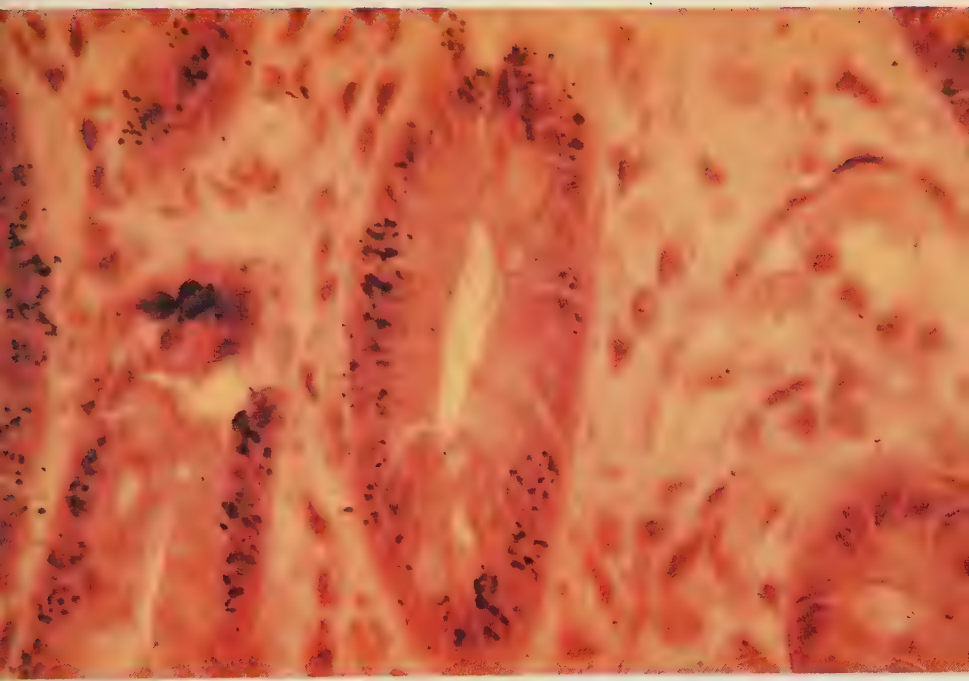

Abb. 6 Präparat aus der Kontrollgruppe

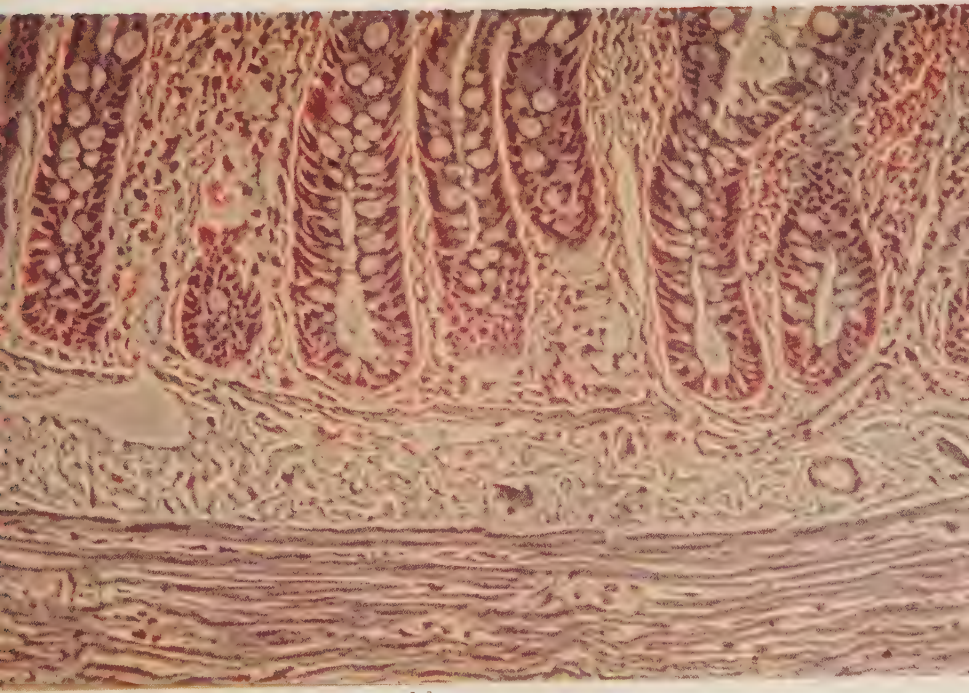

Abb. 7 Übersichtsbild Normaldarm

4 DISKUSSION

Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte unter folgenden theoretischen Voraussetzungen:

Die DNS der Zelle ist stoffwechselstabil und keinem Stoffumsatz unterworfen (HUGHES (11)).
Die Chromosomenverdopplung findet innerhalb einer ca. sechs Stunden dauernden DNS-Synthesezeit vor der folgenden Mitose statt (FIRKET (9), PAINTER et al. (20), CRONKITE et al. (4), HUGHES (11), SCHULTZE et al. (27)).
Nach Beendigung der Synthesezeit und nach einer 60 min. dauernden prämitotischen Ruhezeit setzt die Mitose ein, deren Dauer ebenfalls etwa 60 Minuten beträgt (QUASTLER et al. (21), SCHULTZE et al. (27), OEHLERT (17)).

Tritium-Thymidin wird ausschließlich während der DNS-Synthesephase in die DNS eingebaut.
Morphologisch ist die ^{3}H-Thymidinmarkierung dem Kern bzw. den Chromosomen zugeordnet.

Nach der Injektion steht das ^{3}H-Thymidin 60 min. zum Einbau zur Verfügung. Während der S-Phase bauen alle synthetisierenden Zellen die gleiche Anzahl markierter Thymidinmoleküle pro Zeiteinheit in ihre DNS ein (KOBURG et al. (12)).
Aus der Länge der einzelnen Phasen ergibt sich im folgenden auch die Zeitdauer zwischen der Injektion des Tritium-Thymidin und dem Töten der Tiere (=Verfügbarkeitszeit).
Werden also die in der S-Phase sich befindenden Zellen zum Zeitpunkt Null markiert, so kann durch die Begrenzung der Verfügbarkeitszeit auf 60 Minuten ver-

hindert werden, daß diese Zellen die Mitosephase erreichen, sich teilen und somit der Markierungsindex falsch hohe Werte annehmen würde (s. Abb. 8). Auch sind während dieser Zeit noch alle markierten Zellen in den Krypten lokalisiert.

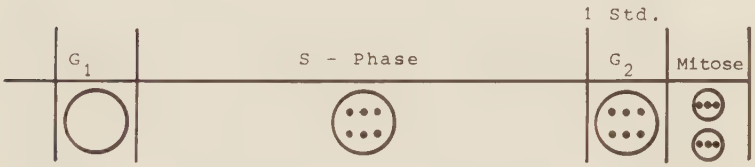

Abb. 8 Schema zur Bestimmung der Verfügbarkeitszeit

Wie schon oben erwähnt, findet nach Applikation von ^{3}H-Thymidin bei kurzen Versuchszeiten nur in den Zellen ein Einbau statt, die sich während der Verfügbarkeitszeit in ihrer DNS-Synthesephase befinden.
Dies sind im Dünndarm die Zellen der Lieberkühnschen Krypten.
Diese Zellager wurden bereits 1902 von SCHAPER (25) als Indifferenzzonen bezeichnet.
In diesen Indifferenzzonen erhält sich der Organismus ein Reservoir an wenig differenzierten, dafür aber zur Teilung fähigen Zellen. Diese Indifferenzzonen sind in den Geweben besonders ausgebildet, in welchen ein dauernder Zellverschleiß eine dauernde Zellneubildung erfordert, damit die Zellzahl und die Gewebsdifferenzierung erhalten werden können.
Bei der mitotischen Teilung dieser wenig differenzierten Zellen entstehen zwei in ihrer prospektiven Potenz unterschiedliche Zellen.

Es handelt sich demnach um inäquale bzw. bivalente Zellteilungen (ROLSHOVEN (24)).

Eine der beiden Tochterzellen wird zur postmitotischen Zelle, die ihre Fähigkeit zur weiteren DNS-Synthese verloren hat, sich ausdifferenziert und nach der Zottenspitze hin verschoben und schließlich abgestoßen wird. Die andere der beiden Tochterzellen verbleibt innerhalb der Indifferenzzone, behält einen niedrigen Differenzierungsgrad und damit auch die Fähigkeit zur weiteren DNS-Synthese und Zellteilung.

Sowohl die Zellneubildung innerhalb der Indifferenzzonen als auch die Abwanderung und die Abstoßung der postmitotischen Zellen verlaufen in einem für das entsprechende Gewebe charakteristischen zeitlichen Rhythmus.
Dieser wird bestimmt durch das Verhältnis der Generationszeiten beider Zellarten zueinander.
Beim Dünndarm liegt die Lebensdauer der postmitotischen Zellen um ein Vielfaches höher als die der intermitotischen Zellen.

Da Zellkonstanz nur gewährleistet ist, wenn der Anzahl der verlorengegangenen Zellen die gleiche Anzahl neugebildeter Zellen gegenüberstehen, ist die Anzahl der Mitosen, die Zahl der markierten Zellen nach Injektion von ^{3}H-Thymidin, d.h. die mittlere Lebensdauer der Zellen der Indifferenzzone, ein Maß für den Zellverschleiß des entsprechenden Gewebes.

Die Regulation dieses Mechanismus übernehmen zum einen mitosehemmende Substanzen (OSGOOD (19)), die von den postmitotischen Zellen abgegeben werden und die in einer bestimmten Konzentration die Mitoseaktivität

der intermitotischen Zellen konstant erhalten. Jeder Zellverlust führt zu einer Konzentrationsminderung dieses Stoffes und damit zu einem Anstieg der Mitosen innerhalb der Indifferenzzone.

Zum anderen zeigte MONTAGNA (16) 1952, daß auch humorale Einwirkungen auf die Mitoseaktivität bestehen.

Tagesrhythmische Schwankungen der Zellregeneration und damit des Markierungsindex sind im Kryptenepithel des Jejunums nicht zu beobachten (AMLACHER (1)).

Diese Mechanismen der Regenerationskinetik der Schleimhaut des Magen-Darm-Kanals, hier speziell der Jejenums, konnten auch in unseren Versuchen bestätigt werden. LÖHRS et al. (14) haben in ihren Untersuchungen mit H^3-Thymidin-Injektion an Mäusen nach einer Verfügbarkeitszeit von 45 min. lediglich in den basalen Zweidritteln bis Dreivierteln der Lieberkühnschen Krypten markierte Zellkerne nachgewiesen. Im Epitelsaum der Zotten wurden zu diesem Zeitraum keine Markierungen gesehen.

Aus den Ergebnissen von MAURER et al. (15), die den Wachstumsmodus der Kryptenepithelien des Rattendünndarms untersucht haben, geht hervor, daß im unteren Teil der Krypten exponentielles Wachstum stattfindet, im oberen Teil dagegen vorwiegend Differenzierungen.

Auch in unseren Präparaten waren vorwiegend die in den basalen Zweidritteln liegenden Krypten markiert. Auch bei der Betrachtung einzelner Krypten konnte eine deutlich dichtere Markierung des unteren Kryptenteils beobachtet werden.

Der histologisch sichtbare regenerative Zustand der Schleimhaut zu den verschiedenen postoperativen Beobachtungszeiten kongruiert mit den in unserer Untersuchung ermittelten Markierungsindices.

Abb. 9 zeigt schematisch die zeitliche Beziehung zwischen Markierungsindex und Entwicklung der Zotten im Darm der Kontrollgruppe und in den Transplantaten:

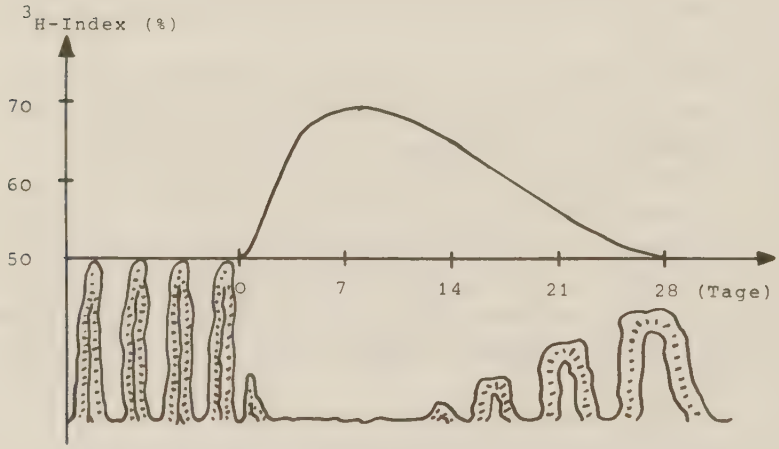

Abb. 9

Unseren Beobachtungen dürfte folgender Mechanismus zugrunde liegen:
Die Ischämie führt zu einem Verlust der Zottenzellen und damit zu einer Konzentrationsminderung der von ihnen abgegebenen mitosehemmenden Stoffe, die im Normaldarm das steady state der physiologischen Regeneration aufrecht erhalten.
Dies bewirkt in den Zellen der Indifferenzzone eine Vermehrung der in der S-Phase befindlichen Zellen

durch eine Verkürzung der Generationszeit, speziell der G_1-Phase (EDER (6)). Der sichtbare Ausdruck dafür ist die Erhöhung des Markierungsindex um beinahe 50 %. Durch diese vermehrte Zellneubildung kommt es zum verstärkten Vorschub von postmitotischen Zellen in Richtung Darmlumen und zu einer Regeneration der Zotten.

Die vermehrte Anzahl der neugebildeten Zottenzellen bewirkt eine Konzentrationserhöhung der von ihnen produzierten mitosehemmenden Substanzen. Auf diese Weise kommt es durch negative Rückkopplung auf die Zellen der Indifferenzzone wieder zur Reduktion des zuvor erhöhten Markierungsindex auf physiologische Werte von 50 %.

Ähnliche Befunde gehen aus den Untersuchungen von EDER et al. (7) hervor, die nach oberflächlichen Säureverätzungen eine gesteigerte Regeneration feststellten. Die vermehrten Mitosen waren dabei aber nicht ausschließlich auf den Erosionsbereich selbst beschränkt, sondern waren auch in benachbarten Krypten zu finden, obwohl deren Zottenepithel unverändert war.
Dieses Phänomen unterstützt die Annahme, daß ein von den Zottenzellen ausgehender mitosehemmender Stoff auf das Teilungsgeschehen in den Krypten entscheidenden Einfluß hat.

Die Tatsache, daß die Zotten trotz Erreichen des steady state nach vier Wochen ihre ursprüngliche Größe und Gestalt noch nicht erreicht hatten, sondern plumper und kürzer blieben, läßt auf eine chronische Schädigung der Transplantatschleimhaut schließen.

Die auch von HOFMANN beschriebene Fibrosierung der Transplantate als Folge der Ischämie und die Desintegration der Dünndarmmotorik als Folge der Denervation bewirken eine Schwächung der Peristaltik, welche die bei allen Tieren gefundene Dilatation der Transplantate bedingen.
Diese Dilatation könnte die bleibende breitbasige Ausziehung und Verkürzung der Zotten bewirken.

Die bei den Tieren III/3 und IV/3 (s. Tab. 2) vorgefundene totale Zerstörung der Mucosa einschließlich der basalen Regenerationsschicht zeigt deutlich die Abhängigkeit der Regenerationspotenz von der Dauer der Ischämiezeit. Bei diesen Tieren lag die längste Ischämiezeit vor, nämlich über 70 Minuten.
In diesem Fall wurde also infolge der Ischämie auch die Wachstumszone in die Schädigung mit einbezogen, sodaß sich die Schleimhaut nicht mehr regenerieren konnte.

Die Ergebnisse unserer Untersuchung lassen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von HOFMANN (10) darauf schließen, daß die Ischämie auf die Regenerationspotenz der Schleimhaut des transplantierten Dünndarms den größten Einfluß hat.
Es zeigt sich, daß durch die Ischämie primär nicht die Regenerationszone geschädigt wird, sondern daß zuerst, d.h. bei kürzeren Ischämiezeiten die Zottenzellen abgestoßen werden und dann bei längeren Ischämiezeiten auch die Kryptenzellen betroffen sind.

Nach der Abstoßung der Zotten als Folge der Ischämie erhöht sich der Markierungsindex im Vergleich zur Kontrollgruppe um etwa 50 % und hat vier Wochen postoperativ den Ausgangswert wieder erreicht.

Der Markierungsindex der Regenerationsschicht der geschädigten Schleimhaut ist abhängig von der Anzahl der Zottenzellen und dieser indirekt proportional.

Ist die Schädigung durch zu lange Ischämiezeiten so weitgehend, daß auch die basale Regenerationszone abgestoßen wird, finden keine Markierungen mehr statt und der Verlust der Schleimhaut ist nicht mehr reversibel.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In eigenen Tierversuchen wird das Operationsverfahren der Dünndarmtransplantation dargestellt und es werden die makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen der Transplantate eine, zwei, drei und vier Wochen nach der Transplantation untersucht.
Eine Woche postoperativ zeigte sich ein totaler Verlust der Zottenstruktur. Nach vier Wochen war es zur Regeneration der Zotten gekommen, sie blieben jedoch kürzer und plumper als beim Normaldarm.

In weiteren Versuchen wird mit Hilfe der quantitativen Autoradiographie mit H^3-Thymidin der Markierungsindex ermittelt und das Regenerationsverhalten der Schleimhaut der Transplantate untersucht.
Es zeigte sich eine Woche postoperativ ein Anstieg des Markierungsindex der Kryptenzellen von 50 % auf 70 %, der nach vier Wochen wieder auf den Wert des Normaldarms mit 50 % abfiel.
Bei zwei Transplantaten mit hoher Ischämiezeit waren keine Markierungen zu sehen, die Schleimhaut zeigte keine Reparation.

Die Ergebnisse unserer Untersuchung lassen darauf schließen, daß die Ischämie wohl den größten Einfluß auf die Regenerationspotenz des transplantierten Dünndarms hat. Es zeigt sich, daß durch die Ischämie primär nicht die Regenerationszone geschädigt wird, sondern daß zuerst, d.h. bei kürzeren Ischämiezeiten, die Zottenzellen abgestoßen werden und erst bei längeren Ischämiezeiten auch die Kryptenzellen betroffen sind.

Nach der Abstoßung der Zotten als Folge der intraoperativen Ischämie erhöht sich der Markierungsindex um etwa 50 % und hat nach vier Wochen den Ausgangswert wieder erreicht.

Der Markierungsindex der Regenerationsschicht der geschädigten Schleimhaut ist abhängig von der Anzahl der Zottenzellen und dieser indirekt proportional. Zur Erklärung dieser Beobachtung wird die Existenz eines Mitosehemmstoffes diskutiert, der von den Zottenzellen produziert werden dürfte.

Ist die Schädigung durch zu lange Ischämiezeiten so weitgehend, daß auch die basale Regenerationszone abgestoßen wird, finden keine Markierungen mehr statt und der Verlust der Schleimhaut ist nicht mehr reversibel.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. AMLACHER, E.: Autoradiographie in Histologie und Cytologie. Stuttgart (1974)

2. BALLINGER, W.F., M.G. CHRISTY and W.B. ASHBY: Autotransplantation of the Small Intestine: The Effect of Denervation. Surgery 52, 151-164 (1962)

3. BUSSMANN, J.F., U. HARTUNG, K.R. LOEWE und W. DIETZE: Beitrag zur freien autologen Dünndarmtransplantation. Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 1972, 119-122

4. CRONKITE, E.P., V.P. BOND, T.M. FLIEDNER und J.R. RUBINI: aus 12. Lab. Invest., 8, 263 (1959)

5. COHEN, Z., A.B. MacGREGOR, K.T.H. MOORE, R.E. FAKL, B. LANGER and J.B. CULLEN: Canine Small Bowel Transplantation. A Study of the Immunological Responses. Arch. Surg. 111, 248-253 (1976)

6. EDER, M.: Zellerneuerung im Magen-Darm-Trakt. Verh. dtsch. Ges. Path. 50, 75-90 (1966)

7. EDER, M. und U. LÖHRS: Experimentelle Regenerationsstörungen der Darmschleimhaut. Dtsch. Arch.klin. Med. 210, 202-216 (1965)

8. EDER, M.: Experimentelle Untersuchungen über Schädigungen der Darmschleimhaut. Verh. dtsch. Ges. Path. 49, 330-332 (1965)

9. FIRKET, H.: aus 18. Arch. Biol. 69, 1 (1958)

10. HOFMANN, U.: Zum derzeitigen Stand der Dünndarmtransplantation. Dissertation Tübingen (1981)

11. HUGHES, W.L., in: STOHLMAN, The Kinetics of Cellular Proliferation. Grune & Stratton, New York-London (1959)

12. KOBURG, E. und W. MAURER: Autoradiographische Untersuchung mit ^{3}H-Thymidin über die Dauer der Desoxyribonucleinsäuresynthese und ihren zeitlichen Verlauf bei den Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus. Biochem. et Biophys. Acta 61, 229-242 (1961)

13. LANG, W.D., D. MÜLLER und W. MAURER: Determination of Thymidine Metabolism in HeLa Cell Cultures by a combined Electrophoretic and Paper Chromatographic Method. Exp. Cell Res., 44, 645 (1966)

14. LÖHRS, U., B. WIEBECKE und M. EDER:
Untersuchungen zur Aussagefähigkeit der Histoautoradiographie mit ^{3}H-Thymidin am Dünndarmepithel.
Histochemie 18, 157-163 (1969)

15. MAURER, W. und B. SCHULTZE:
Die Bedeutung der quantitativen Autoradiographie für zellkinetische Untersuchungen.
Acta histochem. Suppl. 16, 25-37 (1976)

16. MONTAGNA, W. in: Internat. Rew. of Cytology.
Academic Press Inc. New York (1952)

17. OEHLERT, W.: Autoradiographische Untersuchungen zum Eiweiß-, Ribonucleinsäuren- und Desoxyribonucleinsäurestoffwechsel der Zelle.
Habilitationsschrift
Freiburg (1960)

18. OEHLERT, W. und T. BÜCHNER: Mechanismus und zeitlicher Ablauf der physiologischen Regeneration im mehrschichtigen Plattenepithel und in der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes der weißen Maus.
Beitr. pathol. Anat. 125, 374-402 (1961)

19. OSGOOD, E.E., in: STOHLMAN, The Kinetics of Cellular Proliferation.
Grune & Stratton, New York-London (1959)

20. PAINTER, R.B. und R.M. DREW: in 18.
Laborat. Invest. 8, 278 (1959)

21. QUASTLER, H., in: STOHLMAN, The Kinetics of Cellular Proliferation.
Grune & Stratton, New York-London (1959)

22. REICHARD, P. und B. ESTBORN:
Utilization of Desoxyribosides in the Synthesis of Polynucleotides.
J. biol. Chem. 188, 839 (1951)

23. ROGERS, A.: Techniques of Autoradiography.
Elsevier Publishing Comp.
Amsterdam-London-New York (1967)

24. ROLSHOVEN, E.: in 18.
Med. Welt 30, 1 (1981)

25. SCHAPER, A.: in 18.
Roux' Arch. Entw. mech. 14, 307 (1902)

26. SCHAPER, A. und C. COHEN: in 18.
Roux' Arch. Entw. mech. 19, 248 (1905)

27. SCHULTZE, B. und W. OEHLERT: in 18.
Science 131, 737 (1960)

28. SCHULTZE, B.: Autoradiography at the Cellular Level. Physical Techniques in Biological Research.
Hsg. Pallister, A.W., New York-London
Academic Press (1969)

29. THIEDE, A., E. DELTZ und S. LEE:
Allogene Dünndarmübertragung bei Inzuchtratten. Transplantationstechnik und morphologische Befunde.
Langenbecks Arch. Chir. Suppl., 29-32 (1976)

7 Lebenslauf

Am 26. September 1950 wurde ich, Michael Martin, als Sohn von Heinrich und Gertrud Martin in Rottweil geboren.

Meine Schulzeit begann ich 1957 in Rottweil.

Von 1962 bis 1967 besuchte ich das humanistisch-musische Domgymnasium in Regensburg.

Die letzten vier Jahre der Schulzeit verbrachte ich am humanistischen Albertus-Magnus-Gymnasium in Rottweil, wo ich 1971 das Abitur ablegte.

Nach der Ableistung des Grundwehrdienstes immatrikulierte ich mich 1973 in Tübingen in Biologie und Theologie.
In Biologie legte ich 1976 das Vordiplom ab.

Im Sommersemester 1977 erhielt ich die Zulassung zum Medizinstudium an der Universität Tübingen, wo ich im Sommer 1981 den 2. Teil des Staatsexamens ablegte.

Vom Wintersemester 1981 bis zum Sommersemester 1982 leistete ich das Praktische Jahr am Städt. Krankenhaus Friedrichshafen ab.

Am 11.10.1982 legte ich den 3. Teil der ärztlichen Prüfung ab.